



TITLE:

CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Uchida, Tsukasa

CITATION:

Uchida, Tsukasa. CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS. 京都大学, 2016, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2016-07-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19926>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	内 田 司
論文題目	CUL2-mediated clearance of misfolded TDP-43 is paradoxically affected by VHL in oligodendrocytes in ALS. (ミスフォールド型 TDP-43 の CUL2 依存性分解機構における VHL 蛋白質の相対的機能と、ALS のオリゴデンドロサイト細胞質封入体形成の関連について)		
(論文内容の要旨)			
<p>筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は進行性に全身の筋萎縮と筋力低下を来す神経難病であり、根治的治療法は存在しない。ALS 組織の凝集体で蓄積するユビキチン陽性異常蛋白質として TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) が同定され、本来核内 RNA 結合蛋白質である TDP-43 の細胞質への異所性局在、異常な断片化と蓄積が様々な病態現象に関与すると示唆されている。現在 ALS は TDP-43 等原因蛋白質の異常構造への変換が易凝集性や機能障害といった病的反応の起因となる「蛋白質ミスフォールディング病」と考えられており、病的構造の把握、除去は有望な治療戦略として期待される。細胞内分解系の中でもユビキチン-プロテアソーム分解系 (UPS) の関与が想定されてはいるものの TDP-43 の分解、蓄積及び凝集体形成に関する分子機構は不明であった。このため TDP-43 の分解機構と ALS 病態との関係の解明を目的とし、まず TDP-43 のユビキチン化酵素の同定を試みた。</p> <p>FLAG 標識付組換え TDP-43 蛋白質を UPS に必要な分子を含む細胞破碎液と共にユビキチン化反応を行い、ジスルフィド架橋剤を用いユビキチン化過程で標識 TDP-43 と架橋剤で結合した蛋白質を回収、結合解離後に質量解析により、cullin2 (CUL2) を同定した。CUL2 は癌関連蛋白質である von Hippel-Lindau protein (VHL) を基質結合蛋白質とする複合体型ユビキチンリガーゼであり、hypoxia inducible factor 1α が基質として知られている。培養細胞の免疫沈降とウェスタンブロット (WB) 法による解析で、VHL が異常構造 TDP-43 を強く認識する事と、VHL/CUL2 複合体が ALS 病巣に存在する TDP-43 の 35 kDa 断片を UPS で分解促進する事が判明し、また TDP-43 内で異常構造の目印となる配列 (246 番グルタミン酸) を特定した。一方興味深い事に VHL 蛋白質単独の過剰発現では TDP-43 は分解が抑制されて Juxta Nuclear Quality control compartment 内で異常に蓄積し、ALS 病態の悪化を再現する事が確認された。更に RNA 干渉法での TDP-43 ノックダウン後、real-time PCR 法及び WB 法で解析した結果 VHL は転写翻訳共に亢進しており、TDP-43 の細胞質への異所性局在による機能欠損と VHL 発現との関係が示唆された。ヒト ALS 症例脊髄病理組織標本における免疫染色では、従来血管系細胞に存在するとされていた VHL は TDP-43 とオリゴデンドロサイトの細胞質、特にグリア細胞質封入体と呼ばれる病的封入体で共存しており、VHL/CUL2 複合体の機能不全がグリア凝集体形成の背景にあることが示唆された。以上の結果は、正常 TDP-43 蛋白質が ALS 発症に関係する異常構造体に変換した際にそれを認識し除去する機構が存在し、その一つが VHL/CUL2 複合体である事を示している。近年 ALS 病態においてオリゴデンドロサイトの重要性が注目されているが、その機能異常に関ると考えられている封入体形成についてはこれまで知見がなく、VHL と CUL2 の調節機構の解明が ALS の病態解明と新たな治療法開発につながると期待される。更に今回特定した TDP-43 の異常構造の目印となる配列についても、診断や治療の分子標的として今後の展開が有望である。</p>			

<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>筋萎縮性側索硬化症 (ALS) において脳脊髄病巣で異常蛋白質として TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) が蓄積する。TDP-43 の異所性局在と断片化と蓄積が病態形成に重要な現象と考えられ、その病的構造除去が根治的治療に直結すると期待される。申請者は TDP-43 の分解、蓄積及び凝集体形成に関する分子機構及びその破綻と ALS 病態を解明する事を目的とし、まず TDP-43 のユビキチンリガーゼ (E3) の同定を試みた。Reversible covalent linked immunoprecipitation (ReCLIP) 法を用いて TDP-43 の E3 として von Hippel-Lindau protein (VHL) とともに複合型リガーゼとして働く Cullin2 (CUL2) を同定した。また VHL が病的なミスフォールド型 TDP-43 を強く認識、更に ALS の病巣にある断片化 TDP-43 の分解を促進する事を解明し、TDP-43 の異常構造の目印となる配列 (246 グルタミン酸) を特定した。ヒト ALS 症例脊髄病理組織で VHL は病的なオリゴデンドロサイト細胞質封入体で TDP-43 と共存を認め、VHL/CUL2 複合体の機能不全が凝集体形成の背景にある事が示唆された。</p> <p>以上の研究は TDP-43 分解凝集に関する分子機構の解明に貢献し、ALS 発症病態に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（ 医 学 ）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 28 年 5 月 26 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日： 年 月 日 以降